

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



**ESTUDO DA MORFOLOGIA DO ESMALTE EM DENTES  
PERMANENTES HÍGIDOS E COM HIPOMINERALIZAÇÃO  
INCISIVO-MOLAR**

SARA DA SILVEIRA TOMÉ

DISSERTAÇÃO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

2017



UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



**ESTUDO DA MORFOLOGIA DO ESMALTE EM DENTES  
PERMANENTES HÍGIDOS E COM HIPOMINERALIZAÇÃO  
INCISIVO-MOLAR**

**SARA DA SILVEIRA TOMÉ**

Dissertação orientada pela Dra. Inês Martins  
e coorientada pela Prof<sup>a</sup> Doutora Paula Faria Marques

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

2017



## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Dra. Inês Martins, pela oportunidade de realização do presente estudo e por toda a ajuda disponibilizada.

À minha coorientadora, Professora Doutora Paula Faria Marques, pelas sugestões e pelo auxílio prestados na concretização deste projeto.

À Professora Doutora Sofia Arantes e Oliveira pela disponibilidade, pelas sugestões e pelo auxílio prestado, assim como a disponibilização das instalações e equipamentos do Laboratório de Biomateriais da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa.

À Dra. Ana Alves, pela ajuda sincera e dedicada, preocupação e interesse pelo meu trabalho. O seu auxílio no laboratório e o seu trabalho foram essenciais para a realização deste projeto.

À Marta, pela amizade, sinceridade e boa disposição. À Inês, pela lealdade, pelos conselhos, pela amizade sem igual e por tudo aquilo é para mim.

À Anaisa e à Ana, amigas de sempre, por crescerem comigo e pelas histórias partilhadas. Aos meus pais, pelo amor, pelos valores, pelo incentivo, por acreditarem em mim e por serem o meu maior exemplo. À Cati, por ser a melhor irmã do mundo.

À minha família, por tudo.



## RESUMO

**Objetivo:** Determinar o protocolo mais eficaz para a remoção de resíduos e revelação da microestrutura do esmalte em dentes definitivos com hipomineralização incisivo-molar (HIM) para observação através de microscopia eletrônica de varrimento (SEM).

**Materiais e métodos:** Estudo experimental *in vitro*, consistindo na aplicação de dois protocolos de remoção de resíduos e revelação dos prismas de esmalte de dentes definitivos hígidos (controle) e dentes definitivos com HIM para observação em SEM. Foram aleatoriamente distribuídos oito espécimes de dentes definitivos por dois grupos (A e B), cada um contendo dois espécimes de dentes hígidos e dois espécimes de dentes com HIM. Estes foram submetidos a profilaxia com escova de polimento e pedra-pomes e banho de ultrassons com etanol a 100%. O grupo A foi submetido ao protocolo A, no qual foram aplicados 2mL de hipoclorito de sódio 5,25% durante 60 segundos como substância desproteinizante e 2mL de ácido fosfórico 10% durante 30 segundos como substância desmineralizante. O grupo B foi submetido ao protocolo B, que diferiu do anterior apenas no tempo de aplicação de ácido fosfórico (20 segundos). Foram obtidas e analisadas microfotografias de SEM dos espécimes.

**Resultados:** O protocolo B removeu a maioria dos resíduos, permitindo a observação da microestrutura do esmalte, sem degradação da mesma. O protocolo A originou resultados semelhantes, contudo, com menor preservação do esmalte. A superfície do esmalte afetado por HIM apresentou-se morfologicamente irregular e menos mineralizada.

**Conclusões:** O protocolo B, através da aplicação de 2mL de hipoclorito de sódio 5,25% durante 60 segundos e de 2mL de ácido fosfórico 10% durante 20 segundos, revelou-se indicado para a remoção de resíduos e revelação da microestrutura do esmalte sem a sua degradação para observação em SEM.

**Palavras-chave:** *Esmalte; hipomineralização incisivo-molar; HIM; microscopia eletrônica de varrimento; SEM; desmineralizante; desproteinizante; ácido fosfórico; hipoclorito de sódio*





## ABSTRACT

**Objective:** To determine the most effective protocol for removal of residues and exposure of enamel microstructure in permanent teeth affected by molar-incisor hypomineralization (MIH) for observation by scanning electron microscope (SEM).

**Materials and methods:** Experimental *in vitro* study, consisting on the application of two protocols for removal of residues and exposure of enamel prisms in healthy permanent teeth (control) and MIH affected permanent teeth for SEM observation. Eight specimens of permanent teeth were randomly distributed by two groups (A and B), each one containing two specimens of healthy teeth and two specimens of MIH affected teeth. These were subjected to pumice prophylaxis with a polishing brush and ultrasound cleaning with 100% ethanol. Group A was subjected to protocol A, in which 2mL of 5,25% sodium hypochlorite were applied for 60 seconds as the deproteinizing substance and 2mL of 10% phosphoric acid for 30 seconds as the demineralizing substance. Group B was subjected to protocol B, which differed from the previous solely in the phosphoric acid application time (20 seconds). SEM microphotographs of the specimens were obtained and analyzed.

**Results:** Protocol B led to the removal of the majority of residues, allowing the observation of enamel microstructure, without causing its degradation. Protocol A led to similar results, however, with less enamel preservation. The surface of MIH affected enamel was morphologically irregular and less mineralized.

**Conclusions:** Protocol B, through the application of 2mL of 5,25% sodium hypochlorite for 60 seconds and 2mL of 10% phosphoric acid for 20 seconds, has revealed to be more suitable for the removal of residues and exposure with preservation of enamel microstructure.

**Key-words:** *Enamel; molar-incisor hypomineralization; MIH; scanning electron microscopy; SEM; demineralizing; deproteinizing; phosphoric acid; sodium hypochlorite*



## ÍNDICE GERAL

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	iii
Abstract .....	v
Abreviaturas .....	xi
I. Introdução .....	1
1. Estrutura dentária hígida .....	1
2. Hipomineralização Incisivo-Molar .....	2
3. Microscopia Eletrónica de Varrimento .....	4
II. Objetivo .....	6
III. Materiais e Métodos .....	7
1. Tipo de estudo .....	7
2. Preparação dos dentes.. .....	7
3. Distribuição dos espécimes pelos grupos .....	10
4. Preparação dos espécimes de acordo com os protocolos .....	10
5. Preparação dos espécimes para observação em SEM .....	11
6. Observação em SEM .....	13
IV. Resultados .....	14
1. Grupo A .....	14
1.1. Espécimes hígidos .....	14
1.2. Espécimes com HIM .....	15
2. Grupo B .....	16
2.1. Espécimes hígidos .....	16
2.2. Espécimes com HIM .....	17
V. Discussão .....	18
VI. Conclusões .....	22
VII. Referências Bibliográficas .....	23
VII. Anexos .....	xii

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Profilaxia com escova de polimento e pedra-pomes .....	7
Figura 2 – Lavagem com água destilada .....	7
Figura 3 – Banho de ultrassons em etanol 100% .....	8
Figura 4 – Aplicação de cola quente no suporte acrílico .....	8
Figura 5 – Dente aderido com cola ao suporte acrílico .....	8
Figura 6 – Disco diamantado .....	9
Figura 7 – Micrótomos de tecidos duros .....	9
Figura 8 – Corte para remoção da raiz .....	9
Figura 9 – Dente após o corte, apresentando a coroa e a raiz separadas .....	9
Figura 10 – Coroa aderida com cola ao suporte acrílico .....	9
Figura 11 – Corte de coroa de dente com HIM para aproveitamento da face mesial, que continha uma opacidade .....	10
Figura 12 – Dente hígido após corte no sentido vestibulo-palatino, apresentando as faces mesial e distal separadas .....	10
Figura 13 – Espécimes do grupo A após aplicação do protocolo A .....	12
Figura 14 – Espécimes do grupo B após aplicação do protocolo B .....	12
Figura 15 – Metalizadora .....	12
Figura 16 – Processamento dos espécimes na metalizadora .....	12
Figura 17 – Espécimes do grupo A após processamento na metalizadora .....	13
Figura 18 – Espécimes do grupo B após processamento na metalizadora .....	13
Figura 19 – Microscópio eletrônico de varrimento .....	13
Figura 20 – Fotografias de SEM de espécime hígido do grupo A .....	14
(a) – 50x; (b) e (c) – 2000x; (d) – 5000x	
Figura 21 – Fotografias de SEM de espécime com HIM do grupo A .....	15
(a) – 50x; (b) e (c) – 2000x; (d) – 5000x	
Figura 22 – Fotografias de SEM de espécime hígido do grupo B .....	16
(a) – 50x; (b) e (c) – 2000x; (d) – 5000x	
Figura 23 – Fotografias de SEM de espécime com HIM do grupo B .....	17
(a) – 50x; (b) e (c) – 2000x; (d) – 5000x	

## **ABREVIATURAS**

CPP-ACP – *Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate*

FEPE – Fratura de esmalte pós-eruptiva

HIM – Hipomineralização incisivo-molar

PMP – Primeiros molares permanentes

SEM – *Scanning electron microscopy*





## I. INTRODUÇÃO

### 1. Estrutura dentária hígida

A estrutura de um dente são é constituída por três tecidos mineralizados: cimento, dentina e esmalte (Bartlett, 2013). O cimento reveste toda a raiz do dente e contribui para a sua ancoragem através da continuidade entre as suas fibras de colagénio e as fibras principais do ligamento periodontal (Bartlett, 2013). A dentina corresponde ao principal constituinte do dente em peso e volume (Ivancik & Arola, 2013). É composta por uma rede de túbulos, os quais se encontram envolvidos pela dentina peritubular (hipermineralizada, sem colagénio) e entre os quais se apresenta a dentina intertubular (matriz de fibrilhas de colagénio tipo I reforçada por nanocristais de hidroxiapatite) (Ivancik & Arola, 2013; Vennat *et al.*, 2017). Menos densa que o esmalte (cerca de 60% de volume mineral), confere flexibilidade ao dente, prevenindo a fratura do esmalte friável subjacente (Bartlett, 2013; Bar-On & Wagner, 2012).

O esmalte, tecido que reveste a coroa do dente, é constituído por cerca de 12% de água, 2% de matéria orgânica e 86% de matéria inorgânica (Bartlett, 2013; Rensburg, 1995; Schroeder, 1991). O componente inorgânico consiste quase exclusivamente em cristais de hidroxiapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), apresentando a seguinte composição: 55,5%  $\text{PO}_4$ , 37% Ca, 3,5%  $\text{CO}_3$ , 0,5% Na e 0,5% Mg (Rensburg, 1995). Estes podem converter-se em fluoroapatite ao sofrerem a substituição dos iões hidroxilo por iões de flúor, a qual apresenta uma menor solubilidade em meio ácido e, portanto, uma maior resistência à cárie (Rensburg, 1995). A unidade básica do esmalte é o prisma de esmalte, o qual resulta da organização dos cristais de hidroxiapatite em feixes de, aproximadamente, 1000 cristais (Rensburg, 1995; Robinson *et al.*, 2000). Os prismas de esmalte estendem-se desde a junção amelo-dentinária (onde apresentam cerca de 3µm de largura) até à superfície (com 6µm de largura) (Rensburg, 1995). A área que circunda os prismas é denominada região interprismática, na qual os cristais apresentam uma orientação diferente da dos prismas (Cate, 1998). O limite entre os cristais do prisma e a região interprismática é conhecido por bainha do prisma, contudo, esta é inexistente na porção cervical, havendo uma confluência dos cristais (Cate, 1998). Em corte transversal, os prismas apresentam uma aparência de “buraco de fechadura” ou “escama de peixe”, com uma extremidade redonda (direcionada para a cúspide/bordo incisal), tipicamente designada por “cabeça” e outra estreita (direcionada para cervical), designada por “cauda” (Rensburg, 1995). Os cristais de hidroxiapatite, por sua vez,



apresentam-se paralelos ao longo eixo dos prismas na “cabeça” e perpendiculares na “cauda” (Rensburg, 1995). A matéria orgânica apresenta-se distribuída entre os cristais de hidroxiapatite, consistindo, maioritariamente, em proteínas insolúveis e pequenas quantidades de hidratos de carbono e lípidos (Rensburg, 1995; Schroeder, 1991). As proteínas do esmalte imaturo são, predominantemente, amelogeninas, as quais se caracterizam pela presença de prolina, leucina, histidina e ácido glutâmico (Rensburg, 1995; Schroeder, 1991). Já o esmalte maturo é composto, maioritariamente, por enamelinas, contendo menores quantidades de prolina, ácido glutâmico e histidina e maiores quantidades de glicina (Rensburg, 1995; Schroeder, 1991).

O esmalte é o tecido mais mineralizado e duro do corpo humano, conferindo proteção ao dente contra a agressão mecânica durante a mastigação (Schroeder, 1991; Xie *et al.*, 2008).

## **2. Hipomineralização Incisivo-Molar**

Segundo Weerheijm *et al.* (2001), a hipomineralização de incisivos-molares (HIM) define-se como uma hipomineralização de origem sistémica que afeta um ou mais molares permanentes e que está frequentemente associada a alterações dos incisivos permanentes. A sua prevalência mundial varia entre 2,4% e 40%, contudo depende do país e do ano de nascimento (Fragelli *et al.*, 2015; Weerheijmk, 2003(a)).

Dados apontam para que a HIM seja de etiologia multifatorial, envolvendo, possivelmente, fatores sistémicos, genéticos e ambientais com efeito sobre a amelogénese (Condò *et al.*, 2012; Lygidakis *et al.*, 2010; Garg *et al.*, 2012; Weerheijmk, 2003(a)). Este é um processo sensível que ocorre em duas fases: uma fase secretória, na qual ocorre a secreção e a deposição do esmalte parcialmente mineralizado em toda a sua espessura; e uma fase de maturação, onde se dá a remoção de matéria orgânica e água do esmalte, de modo a permitir o influxo de mineral (Weerheijmk, 2003(a)). A existência de primeiros molares permanentes (PMP) afetados em conjunto com incisivos permanentes afetados sugere que a HIM resultará de fatores com efeito específico sobre a amelogénese durante um período limitado de tempo (Weerheijmk, 2003(a)). De referir que a amelogénese dos PMP se inicia entre a 28<sup>a</sup> semana *in utero* e os primeiros 10 dias de vida (Lygidakis *et al.*, 2008). Os ameloblastos, por sua vez, são das células mais sensíveis do corpo humano (Lygidakis *et al.*, 2008). Se a sua função é interrompida temporária ou permanentemente, pode originar-se uma hipoplasia ou hipomineralização e tal dependerá do momento da ocorrência (Lygidakis *et al.*, 2008). Assim, a etiologia da HIM pode estar associada a

complicações pré-natais, peri-natais, ou pós natais (Condò *et al.*, 2012). Alguns exemplos são a hipocalcemia materna, uso de medicação espasmolítica durante a gravidez, parto prematuro, problemas respiratórios no recém-nascido (relacionados com níveis baixos de oxigênio), ou presença de dioxinas no leite materno (Condò *et al.*, 2012; Garg *et al.*, 2012; Weerheijmk, 2003(a)).

Clinicamente, o esmalte dos dentes afetados, de espessura normal, apresenta opacidades demarcadas de cor branca, amarela ou castanha, com aparência macia e porosa semelhante a giz ou queijo (Weerheijmk, 2003(a); Weerheijmk, 2003(b)). A sua elevada porosidade pode conduzir à fratura do esmalte imediatamente após a erupção dentária como resultado das forças mastigatórias, expondo a dentina e facilitando o desenvolvimento de lesões de cárie dentária (Fragelli *et al.*, 2015; Weerheijmk, 2003(a)). A fratura de esmalte pós-eruptiva (FEPE) pode ocorrer tão rapidamente que aparente não ter havido formação de esmalte, podendo conferir, assim, um quadro clinicamente semelhante a hipoplasia de esmalte (Allazzam *et al.*, 2014). Contudo, nesta condição, o esmalte circundante apresenta margens lisas, enquanto na HIM estas se apresentam irregulares (Allazzam *et al.*, 2014). A expressão das lesões ocorre de modo assimétrico, podendo haver coexistência de diferentes graus de severidade no mesmo indivíduo (Weerheijmk, 2003(a)). Contudo, quando um defeito severo está presente num molar, é altamente provável que o dente contralateral também esteja afetado (Weerheijmk, 2003(a)). Quanto maior o número de molares afetados, maior a probabilidade de existirem incisivos afetados (Weerheijmk, 2003(a); Allazzam *et al.*, 2014).

Perante as características apresentadas, foram desenvolvidos os seguintes critérios de diagnóstico de HIM: (a) presença de opacidade demarcada; (b) presença de FEPE; (c) presença de restaurações atípicas (abrangem as faces vestibular ou lingual/palatina) (Weerheijmk, 2003(b)). A HIM pode classificar-se quanto à severidade como ligeira, moderada ou severa (Lygidakis, 2010). O tipo ligeiro caracteriza-se por opacidades demarcadas nas zonas de maior tensão mecânica dos PMP, sem perda de esmalte nas opacidades, ausência de hipersensibilidade ou lesões de cárie associadas às áreas afetadas, podendo haver envolvimento ligeiro dos incisivos permanentes (Lygidakis, 2010). O tipo moderado está associado a restaurações atípicas intactas, presença de opacidades demarcadas sem FEPE, ausência de hipersensibilidade e existência de preocupações estéticas (Lygidakis, 2010). O tipo severo é descrito pela presença de FEPE, história de hipersensibilidade dentária, lesões de cárie associadas ao

esmalte afetado, restaurações atípicas insatisfatórias e preocupações estéticas ao nível dos incisivos (Lygidakis, 2010). Segundo o mesmo autor, pode ser agrupada como ligeira ou severa, de modo a facilitar o registo pelo clínico.

Os dentes com HIM tendem a gerar desconforto na criança devido à elevada sensibilidade dentária (Weerheijmk, 2003(a)). Esta pode manifestar-se perante estímulos térmicos e mecânicos como a ingestão de alimentos quentes ou frios, inspiração de ar frio ou escovagem dentária (Oyedele *et al.*, 2016; Weerheijmk, 2003(a)). Consequentemente, a criança apresenta uma tendência para evitar a escovagem dos dentes afetados, o que agrava o risco de desenvolvimento de lesões de cárie já por si elevado (Oyedele TA, 2016; Weerheijmk, 2003(a)). A HIM acarreta, ainda, implicações para o médico dentista e para os tratamentos dentários, nomeadamente, a dificuldade em obter uma anestesia adequada dos dentes afetados, provavelmente, devido à inflamação subclínica da polpa consequente à elevada porosidade do esmalte (Allazzam *et al.*, 2014). As características morfológicas do esmalte alterado levam, ainda, a uma reduzida adesão aos materiais restauradores, o que condiciona o seu frequente insucesso e tratamentos repetitivos (Allazzam *et al.*, 2014). É também difícil prever os locais de fratura do esmalte hipomineralizado aparentemente são (Weerheijmk, 2003(a)). Como consequência das complicações associadas à HIM, as crianças com dentes afetados podem apresentar-se mais receosas e pouco cooperantes (Allazzam *et al.*, 2014).

### **3. Microscopia Eletrónica de Varrimento**

O microscópio eletrónico de varrimento (SEM) é um dos instrumentos mais versáteis disponíveis para análise de microestrutura e composição química. (Zhou & Wang, 2007) A produção de imagem ocorre graças à emissão de um feixe de eletrões sobre a amostra, o qual efetua um varrimento sistemático da mesma, produzindo inúmeros sinais que são, posteriormente, convertidos em sinais visuais (Zhou & Wang, 2007). A observação de amostras de nanomateriais não-condutores, como é o caso dos nanomateriais bioorgânicos, requer um revestimento metálico, de modo a permitir a interação com o feixe de eletrões. (Zhou & Wang, 2007)

O desenvolvimento de um protocolo para remoção de resíduos e revelação da microestrutura do esmalte em SEM revela-se pertinente, de modo a permitir a uniformização e reprodutibilidade de procedimentos para obtenção e análise de imagens. Deve garantir a observação de imagens nítidas, sendo potencialmente útil para o estudo de defeitos de desenvolvimento do esmalte, como é o caso da HIM. O estudo

desta condição é fundamental para que seja possível alcançar soluções que permitam ultrapassar as dificuldades que esta patologia acarreta, nomeadamente, a hipersensibilidade dentária, o risco elevado de cárie e o insucesso dos sistemas adesivos.

## **II. OBJETIVO**

O presente estudo tem por objetivo a determinação do protocolo mais eficaz para a remoção de resíduos e revelação da microestrutura do esmalte em dentes definitivos com HIM para observação em SEM.

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1. Tipo de estudo

Estudo experimental *in vitro*, consistindo na aplicação de dois protocolos de remoção de resíduos e revelação dos prismas de esmalte de dentes definitivos hígidos (grupo de controlo) e dentes definitivos com HIM para observação em SEM.

#### 2. Preparação dos dentes

1) Realizou-se profilaxia com uma escova de polimento em baixa rotação com pedra-pomes (0,04 mg de pedra-pomes:0,8mL de água) durante 60 segundos (Fig.1).

2) De seguida, lavou-se abundantemente cada dente com água destilada durante 60 segundos (Fig.2).



**Fig. 1** – Profilaxia com escova de polimento e pedra-pomes



**Fig. 2** – Lavagem com água destilada

3) Submeteu-se cada dente a um banho de ultrassons em etanol 100% durante 60 segundos com recurso ao aparelho de banho de limpeza ultrassónico Bransonic® M2800-E, Emerson, nº de série BHS021631000B (Fig.3).



**Fig. 3** – Banho de ultrassons em etanol 100%

4) Colaram-se os dentes em suportes acrílicos, paralelamente ao seu longo eixo, com recurso a uma pistola de cola quente (Figs.4 e 5).



**Fig.4** – Aplicação de cola quente no suporte acrílico

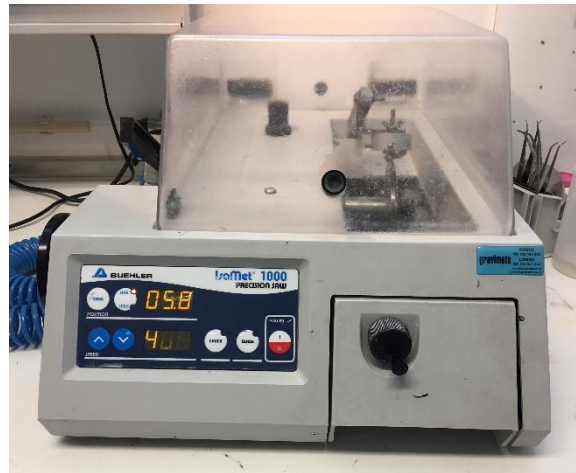


**Fig. 5** – Dente aderido com cola ao suporte acrílico

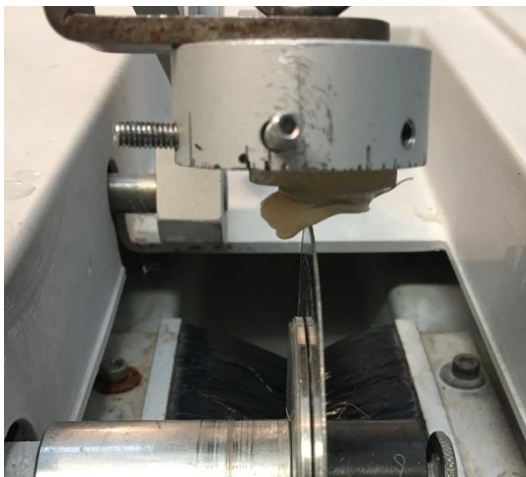
5) Realizaram-se cortes ao nível da junção amelo-cementária, paralelamente às superfícies oclusais dos dentes, a fim de remover as raízes. Recorreu-se a um disco diamantado (Lapcraft DIA Laser Blade, 4’’x0.012’’x1, USA; nº de série 204007), num micrótomo de tecidos duros (Isomet™ 1000 Precision Saw, Buehler Ltd., nº de série 666-1PS-03318, Lake Bluff, IL, USA) à velocidade de 400rpm e sob refrigeração (Figs. 6, 7, 8 e 9).



**Fig.6** – Disco diamantado



**Fig. 7** – Micrótomo de tecidos duros

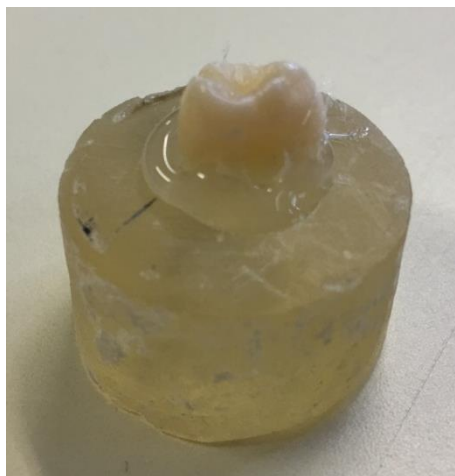


**Fig. 8** – Corte para remoção da raiz



**Fig. 9** – Dente após o corte, apresentando a coroa e a raiz separadas

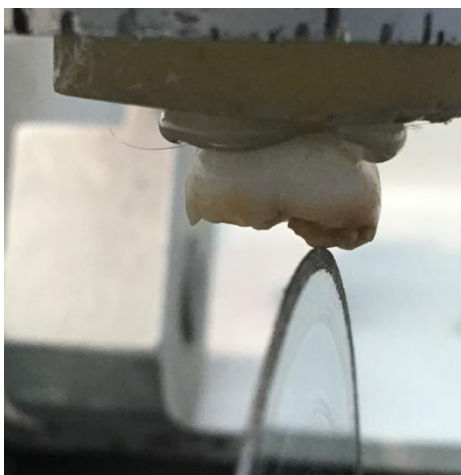
6) Colaram-se as coroas das peças dentárias em suportes acrílicos, perpendicularmente ao seu eixo, com uma pistola de cola quente (Fig. 10).



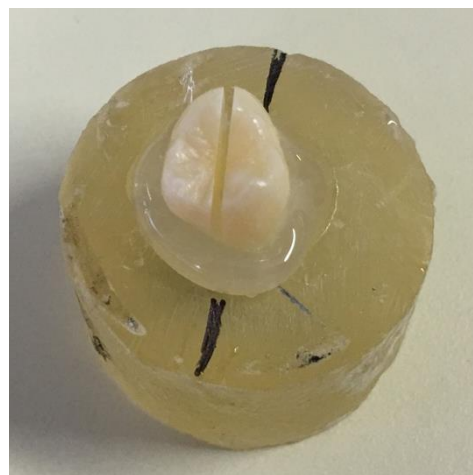
**Fig. 10** – Coroa aderida com cola ao suporte acrílico



7) Nos dentes hígidos realizaram-se cortes, perpendicularmente às superfícies oclusais, nos sentidos vestibulo-lingual ou vestibulo-palatino, a fim de obter um fragmento contendo a face mesial e outro fragmento contendo a face distal (Fig.12). Nos dentes com HIM, realizaram-se cortes, perpendicularmente às superfícies oclusais, a fim de obter duas faces com lesões de HIM por cada peça dentária (Fig.11). Recorreu-se ao disco diamantado e ao micrótomo de tecidos duros utilizados previamente.



**Fig. 11** – Corte de coroa de dente com HIM para aproveitamento da face mesial, que continha uma opacidade



**Fig. 12** – Dente hígido após corte no sentido vestibulo-palatino, apresentando as faces mesial e distal separadas

### 3. Distribuição dos espécimes pelos grupos

Após a realização dos cortes, obtiveram-se oito espécimes, sendo quatro de dentes definitivos hígidos (grupo de controlo) e quatro de dentes definitivos com HIM. Assim, foi realizada a distribuição aleatória dos mesmos por dois grupos, cada um contendo dois espécimes de dentes hígidos e dois espécimes de dentes com HIM, catalogados do seguinte modo:

Grupo A	A1; A2 (hígidos)
	A3; A4 (HIM)
Grupo B	B1; B2 (hígidos)
	B3; B4 (HIM)

### 4. Preparação dos espécimes de acordo com os protocolos

Pretende-se que os protocolos removam os resíduos existentes na superfície do esmalte, não removendo estrutura dentária.

#### Protocolo A – Grupo A:

- 1) Condicionamento das superfícies de esmalte de cada espécime com 2mL de hipoclorito de sódio 5,25% com pipeta milimétrica durante 60 segundos.
- 2) Lavagem com água destilada durante 10 segundos.
- 3) Banho de ultrassons em etanol 100% durante 60 segundos.
- 4) Lavagem com água destilada durante 5 segundos.
- 5) Secagem com seringa de ar durante 10 segundos.
- 6) Condicionamento das superfícies de esmalte de cada espécime com 2mL de ácido fosfórico 10% com pipeta milimétrica durante 30 segundos.
- 7) Lavagem com água destilada durante 10 segundos.
- 8) Banho de ultrassons em etanol 100% durante 60 segundos.
- 9) Lavagem com água destilada durante 5 segundos.
- 10) Secagem com seringa de ar durante 10 segundos.

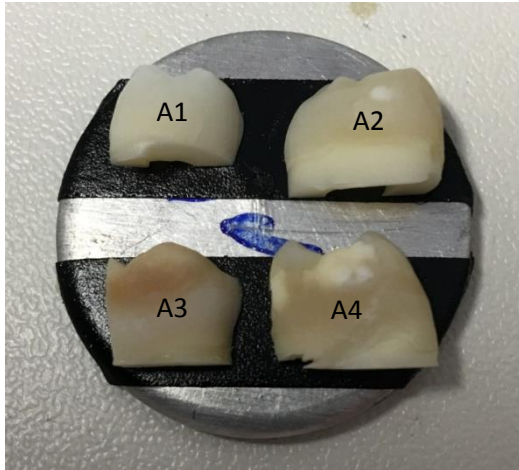
#### Protocolo B – Grupo B:

- 1) Condicionamento das superfícies de esmalte de cada espécime com 2mL de hipoclorito de sódio 5,25% com pipeta milimétrica durante 60 segundos.
- 2) Lavagem com água destilada durante 10 segundos.
- 3) Banho de ultrassons em etanol 100% durante 60 segundos.
- 4) Lavagem com água destilada durante 5 segundos.
- 5) Secagem com seringa de ar durante 10 segundos.
- 6) Condicionamento das superfícies de esmalte de cada espécime com 2mL de ácido fosfórico 10% com pipeta milimétrica durante 20 segundos.
- 7) Lavagem com água destilada durante 10 segundos.
- 8) Banho de ultrassons em etanol 100% durante 60 segundos.
- 9) Lavagem com água destilada durante 5 segundos.
- 10) Secagem com seringa de ar durante 10 segundos.

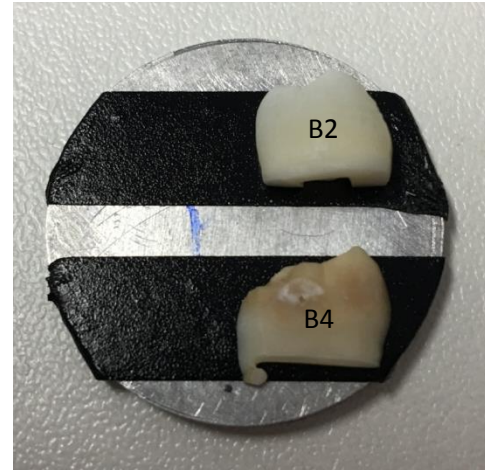
### **5. Preparação dos espécimes para observação em SEM**

Após a preparação dos espécimes de acordo com os protocolos, estes foram aderidos a discos metálicos com fita de carbono de dupla face (NEM TAPE, Nisshin Em.Co, Ltd., Japão) e catalogados de acordo com o respectivo grupo (Figs.13 e 14). De

referir que os espécimes B1 (hígido) e B3 (HIM) não foram incluídos na observação e análise em SEM, devido a um erro laboratorial, que levou à aplicação excessiva de hipoclorito de sódio 5,25% nos mesmos.



**Fig. 13** – Espécimes do grupo A após aplicação do protocolo A

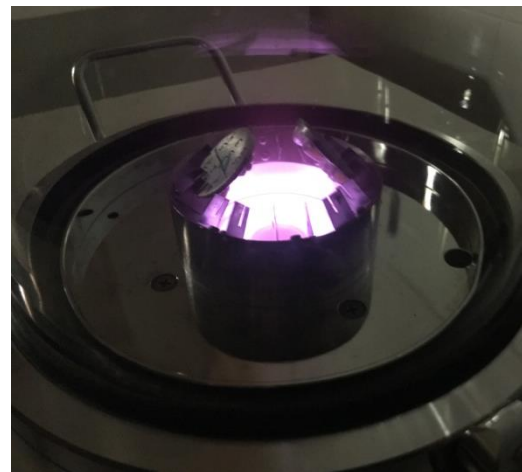


**Fig. 14** – Espécimes do grupo B após aplicação do protocolo B

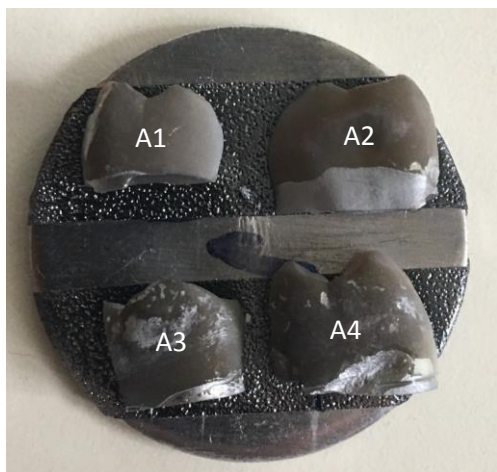
De seguida, os espécimes foram processados numa metalizadora com atmosfera de árgon e 200nm de ouro/paládio (Jeol JFC-1100E, nº de série SM333132-670, Tóquio, Japão) (Figs.15, 16, 17 e 18).



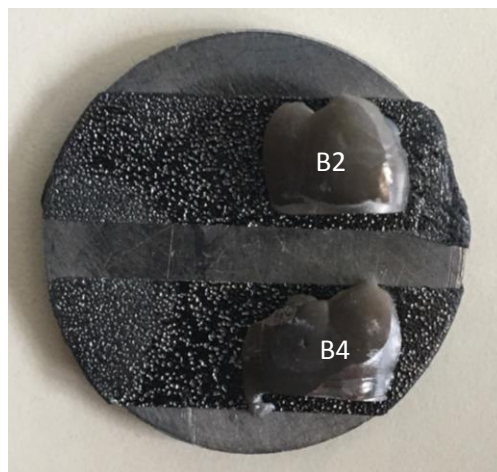
**Fig. 15** – Metalizadora



**Fig. 16** – Processamento dos espécimes na metalizadora



**Fig. 17** – Espécimes do grupo A após processamento na metalizadora



**Fig. 18** – Espécimes do grupo B após processamento na metalizadora

## 6. Observação em SEM

As superfícies dos espécimes foram examinadas com recurso ao microscópio eletrónico de varrimento (Hitachi S-450, nº de série 5333884, Tóquio, Japão) (Fig.19). Foram obtidas microfotografias de áreas representativas de cada espécime com ampliações de 50x, 2000x e 5000x. Todas as imagens foram obtidas com o *software* Espirit 1.8.2.2167 (Bruker, MA, EUA), tendo sido, posteriormente, analisadas e comparadas. De referir que nos espécimes de dentes afetados por HIM foram obtidas imagens das zonas das respetivas lesões de hipomineralização, nomeadamente, lesões amarelas no espécime A3 e brancas nos espécimes A4 e B4.

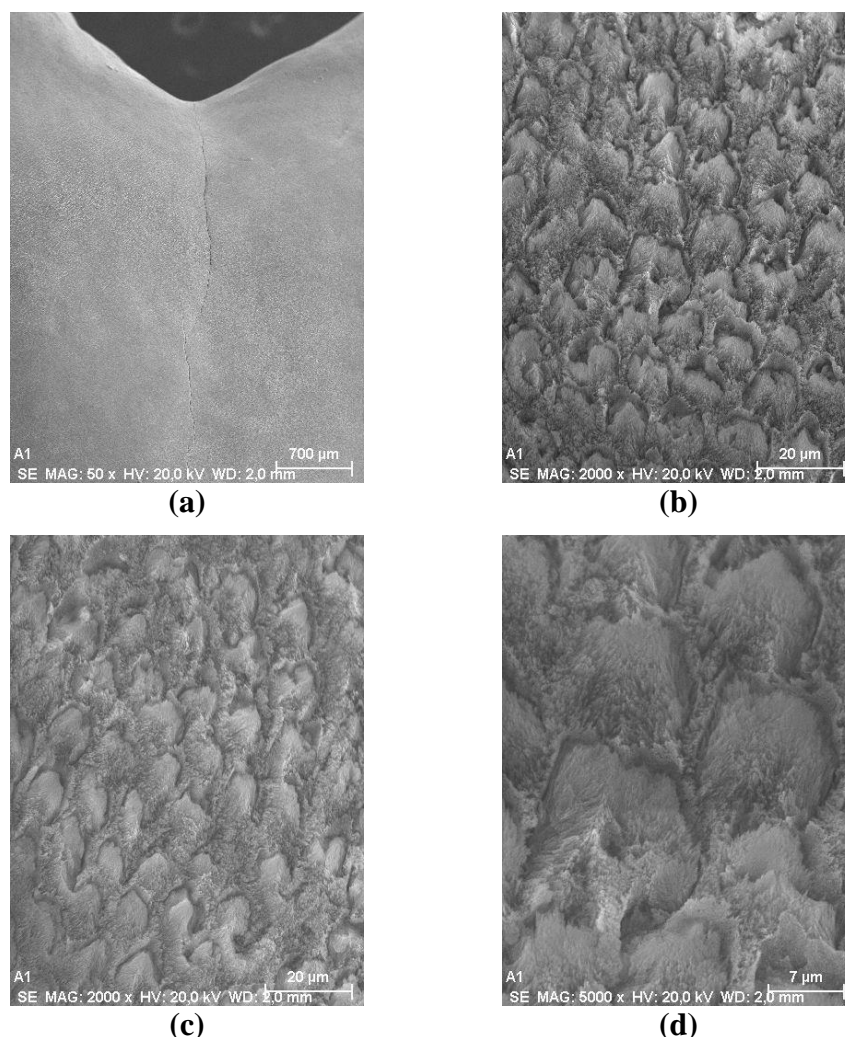


**Fig. 19** – Microscópio eletrónico de varrimento

## IV. RESULTADOS

### 1. Grupo A

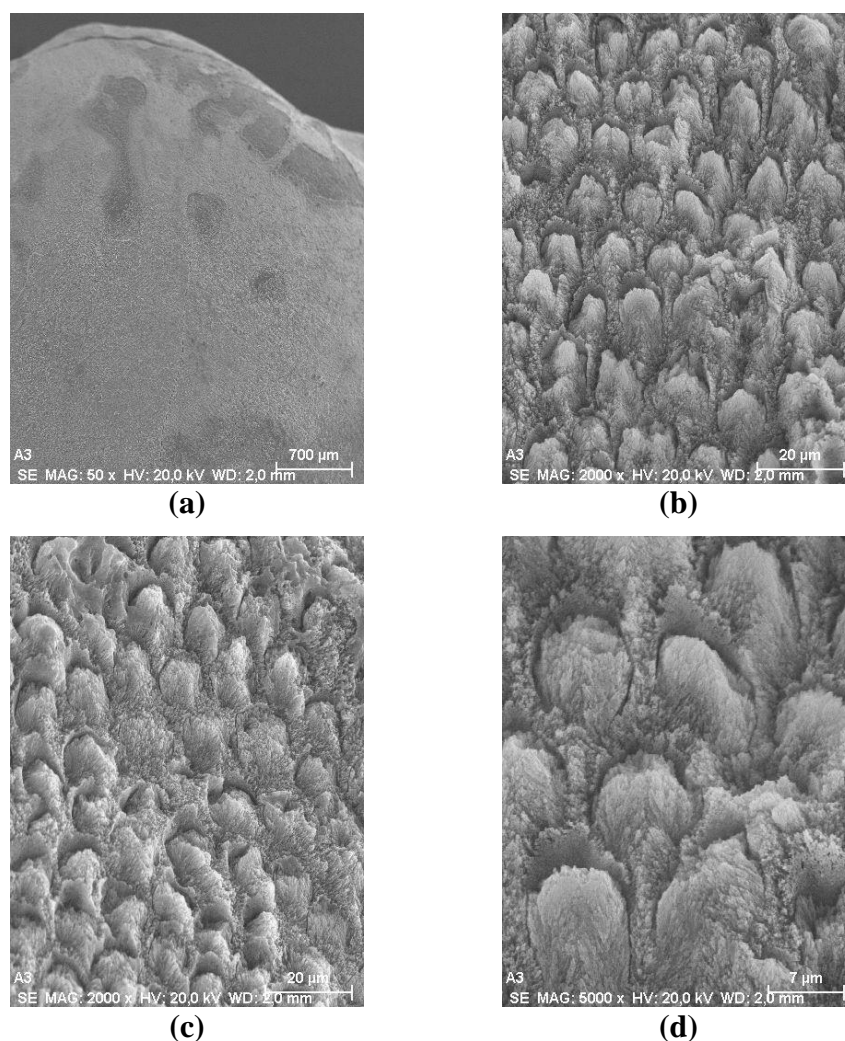
#### 1.1. Espécimes hígidos



**Fig. 20** – Fotografias de SEM de espécime hígido do grupo A  
(a) 50x; (b) e (c) 2000x; (d) 5000x

Nas imagens de SEM dos espécimes hígidos do grupo A foi possível identificar os prismas de esmalte rodeados pelos cristais da região interprismática. Estes cristais apresentaram uma direção diferente da dos prismas. A superfície apresentou-se, maioritariamente, isenta de detritos. As restantes imagens de SEM dos espécimes hígidos do grupo A encontram-se nos anexos I e II.

## 1.2. Espécimes com HIM



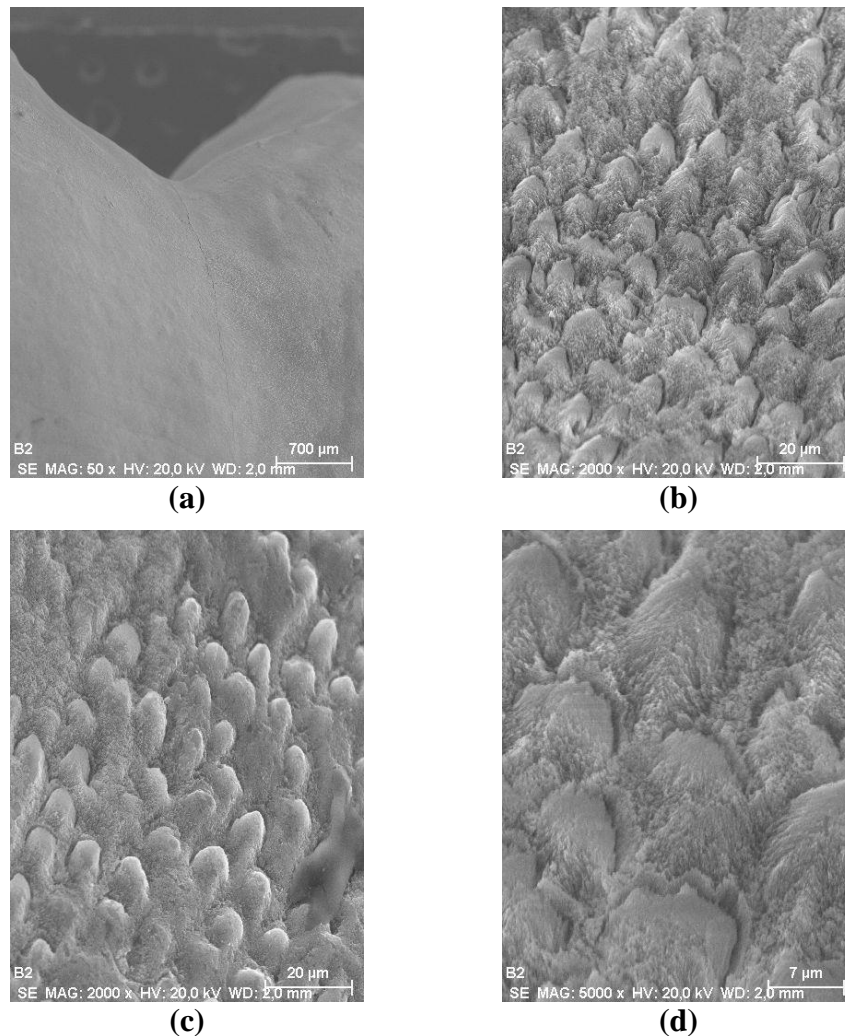
**Fig. 21** – Fotografias de SEM de espécime com HIM do grupo A  
(a) 50x; (b) e (c) 2000x; (d) 5000x

A superfície dos espécimes com HIM do grupo A apresentou-se semelhante à dos espécimes hígidos do mesmo grupo, contudo, com mais irregularidades e com um espaço maior entre os prismas de esmalte e a região interprismática. As restantes imagens de SEM dos espécimes com HIM do grupo A encontram-se nos anexos III e IV.



## 2. Grupo B

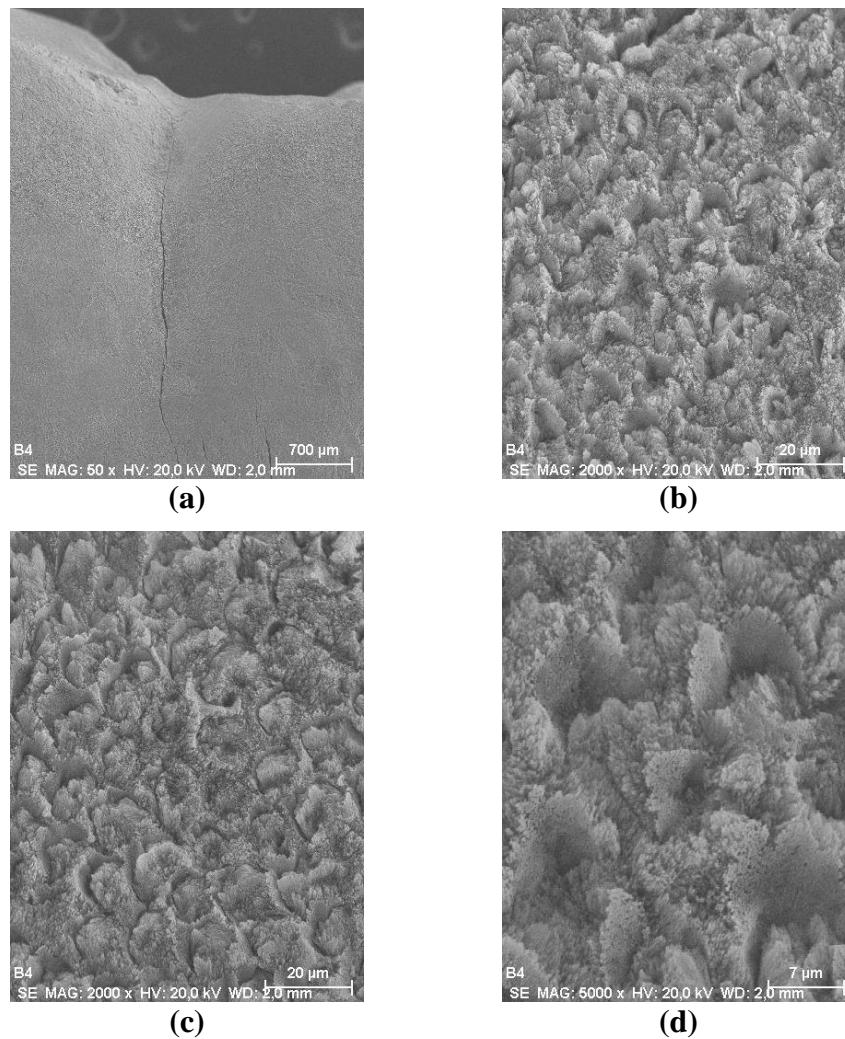
### 2.1. Espécimes hígidos



**Fig. 22** – Fotografias de SEM de espécime hígido do grupo B  
(a) 50x; (b) e (c) 2000x; (d) 5000x

Morfológicamente, o espécime hígido do grupo B exibiu uma superfície maioritariamente isenta de detritos, sendo possível identificar os prismas de esmalte rodeados pela região interprismática. Os cristais da região interprismática apresentaram-se menos irregulares que os dos espécimes hígidos do grupo A. As imagens de SEM do espécime hígido do grupo B encontram-se no anexo V.

## 2.2. Espécimes com HIM



**Fig. 23** – Fotografias de SEM de espécime com HIM do grupo B  
(a) 50x; (b) e (c) 2000x; (d) 5000x

A análise microscópica dos espécimes com HIM do grupo B revelou uma superfície maioritariamente isenta de detritos, sendo identificáveis os prismas de esmalte e a região interprismática. O espaço entre os prismas e a região interprismática apresentou-se maior que nos dentes hígidos do mesmo grupo. As imagens de SEM do espécime com HIM do grupo B encontram-se no anexo VI.



## V. DISCUSSÃO

A observação da superfície de esmalte em SEM pressupõe a ausência de quaisquer detritos que impeçam a visualização da sua morfologia e a manutenção de uma superfície intacta. A superfície do esmalte apresenta resíduos de matéria inorgânica e matéria orgânica, os quais podem ser removidos com recurso a substâncias desmineralizantes e desproteinizantes, respetivamente (Agarwal *et al.*, 2015).

A aplicação de ácido sobre o esmalte permite, maioritariamente, a sua desmineralização superficial, através da dissolução dos seus cristais (Cate, 1998). A sua ação é particularmente evidente nas extremidades dos mesmos, daí que haja uma maior suscetibilidade naqueles orientados perpendicularmente à superfície do esmalte (Cate, 1998). Buonocure, em 1955, introduziu o condicionamento ácido, que consiste na criação de microrretenções na superfície dentária, através da dissolução seletiva dos seus cristais, sendo o ácido fosfórico a 35% uma das substâncias mais usadas em dentisteria adesiva (Bogra & Kaswan., 2003; Mazaheri *et al.*, 2015; Nagar *et al.* 2015). Segundo Cehreli & Altay (2000), a aplicação de ácido fosfórico a 37% durante 60 segundos permite a obtenção de uma superfície de esmalte rugosa. Assim, a sua aplicação em concentrações de 30-40% durante 60 segundos pode originar três padrões diferentes de desmineralização (Cate, 1998). O mais comum, tipo I, caracteriza-se pela remoção preferencial das porções centrais dos bastões; o tipo II remove a periferia; o tipo III é irregular (Cate, 1998). Contudo, quando o objetivo é a observação da microestrutura do esmalte em SEM, estas concentrações poderão revelar-se demasiado elevadas, levando à excessiva desmineralização da superfície do esmalte, com remoção de estrutura dentária e impedindo a sua correta visualização. Tendo em vista a remoção apenas dos detritos existentes na superfície do esmalte, o ácido fosfórico revela-se potencialmente útil, contudo, torna-se necessária a utilização de concentrações mais baixas.

Soluções de hipoclorito de sódio têm sido amplamente utilizadas em procedimentos dentários, nomeadamente, preparações endodônticas químio-mecânicas, remoção químio-mecânica de lesões de cárie em dentina e sistemas adesivos em dentina (Gowda & Mohan 2012). O hipoclorito de sódio a 5,25% permite a dissolução da matéria orgânica, através da desnaturação proteica (Trindade *et al.*, 2013; Venezie *et al.*, 1994). O seu efeito baseia-se na ação dos iões cloreto sobre as proteínas, formando cloraminas, que são solúveis em água (Gowda & Mohan 2012). Além disso, a sua

aplicação prévia à do ácido fosfórico facilita o acesso do mesmo aos cristais de esmalte previamente revestidos por proteínas insolúveis em meio ácido (Trindade *et al.*, 2013; Venezie *et al.*, 1994). Têm sido realizados estudos para remoção dos componentes orgânicos em dentina com aplicação de hipoclorito de sódio em concentrações de 1-10% durante 20-120 segundos (Gowda & Mohan 2012; Hassan *et al.*, 2014).

Com base na literatura existente, foi utilizado o ácido fosfórico a 10% como substância desmineralizante e o hipoclorito de sódio a 5,25% como substância desproteinizante.

A profilaxia com escova de polimento a baixa rotação com pedra-pomes e água destilada é um método abrasivo físico que permite a remoção mecânica dos detritos (Ansari *et al.*, 2004; Riviera-Prado *et al.*, 2015). O banho ultrassônico permite, através da criação de cavitação no tanque, a eliminação de zonas mortas. Estes procedimentos prévios à aplicação dos protocolos favorecem a ação das substâncias usadas.

Aquando da realização dos cortes, foram selecionadas as faces distais e mesiais dos dentes hígidos para observação em SEM, visto serem as mais planas.

### **Grupo A (Protocolo A) versus Grupo B (Protocolo B)**

Em ambos os grupos A e B foi possível observar a morfologia do esmalte, sendo nitidamente identificáveis os prismas de esmalte rodeados pelos cristais da região interprismática, os quais apresentam uma direção diferente da dos prismas. As imagens obtidas são compatíveis com a aparência típica de “escama de peixe” descrita na literatura. A ausência quase total de resíduos permite inferir que os dois protocolos utilizados, assim como a profilaxia e banho de ultrassons prévios, foram eficazes na sua remoção.

Nas imagens de SEM dos espécimes do grupo A verificou-se uma maior quantidade de irregularidades nos cristais da região interprismática, comparativamente às do grupo B. Depreende-se, assim, que ocorreu uma desmineralização mais extensa da superfície dos espécimes do grupo A, visto que as respectivas irregularidades refletem a dissolução seletiva dos cristais. Tendo em conta que a única variável entre os dois grupos foi o tempo de aplicação de ácido fosfórico, deduz-se que a desmineralização excessiva dos espécimes do grupo A resultou do tempo superior de aplicação da referida substância, comparativamente ao grupo B. Assim, depreende-se que o protocolo A, no qual o ácido fosfórico foi aplicado durante 30 segundos, é demasiadamente invasivo para a remoção dos resíduos, removendo, desnecessariamente, estrutura dentária. O

protocolo B, no qual o ácido fosfórico foi aplicado durante 20 segundos, apresenta uma maior eficácia, uma vez que cumpre o objetivo principal, sem remoção desnecessária de estrutura dentária.

### **Dentes hígidos *versus* Dentes com HIM**

A eficácia de ambos os protocolos utilizados permitiu a análise da microestrutura do esmalte afetado de dentes com HIM, através da comparação com o esmalte de dentes hígidos, utilizados como controlo.

Ao comparar as imagens de SEM dos espécimes de dentes hígidos do grupo A com os espécimes de dentes com HIM do mesmo grupo, verificou-se uma maior quantidade de irregularidades na superfície das lesões dos espécimes afetados por HIM. Além disso, o espaço entre os prismas e a região interprismática apresentou-se maior nos espécimes com HIM. O mesmo se infere quando se comparam as imagens de SEM dos espécimes de dentes hígidos do grupo B com os espécimes de dentes com HIM do mesmo grupo. As referidas comparações são viáveis ao estabelecimento de ilações, na medida em que são realizadas dentro dos mesmos grupos, onde os protocolos usados foram os mesmos.

Assim, depreende-se que a superfície do esmalte das lesões de HIM se pode caracterizar por irregularidade e desorganização, associadas a uma menor quantidade de estrutura mineral, assim como uma suscetibilidade superior a procedimentos de remoção de resíduos e revelação da microestrutura do esmalte. As características morfológicas observadas poderão justificar as dificuldades e limitações verificadas nos dentes afetados por HIM. As referidas deduções são compatíveis com a literatura existente. Segundo Bozal *et al.*, 2015, o esmalte afetado por lesões de HIM caracteriza-se por apresentar menor concentração mineral, menor organização da estrutura cristalina, porosidade superior, teor superior de iões carbonato e uma menor razão de iões cálcio/fosfato, resultando em propriedades mecânicas inferiores às dos dentes hígidos. Além disso, o condicionamento do esmalte com ácido fosfórico atua de modo diferente em dentes com HIM, o que pode interferir com os mecanismos de adesão, produzindo um padrão de desmineralização incompatível com os requisitos de uma restauração com técnica adesiva eficaz (Bozal *et al.*, 2015).

De referir que as diferenças observadas em SEM entre dentes com HIM e dentes hígidos são menores do que aquelas que seriam de esperar, comparativamente às diferenças clinicamente observáveis.

O desenvolvimento de um protocolo para remoção de resíduos da superfície do esmalte e revelação da sua microestrutura para observação em SEM manifestou-se útil para o estudo da morfologia do esmalte afetado por lesões de HIM e sua comparação com o esmalte de dentes hígidos. O conhecimento da microestrutura do esmalte afetado pela referida condição revela-se uma potencial etapa precursora para o estabelecimento de soluções que minimizem ou eliminem as consequências desvantajosas que advêm da HIM. Em particular, o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas adequadas aos dentes afetados. É de considerar a criação de técnicas adesivas que ultrapassem o insucesso verificado nas restaurações adesivas realizadas nos dentes com HIM. Salienta-se, ainda, a necessidade de mais estudos com CPP-ACP (*Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate*). Este apresenta a capacidade de criar e estabilizar uma solução supersaturada em cálcio e fosfato, que se deposita na superfície do esmalte (Lygidakis, 2010). Tem sido empiricamente referido que a aplicação de pasta contendo CPP-ACP em ambulatório promove a selagem e a dessensibilização de dentes com HIM, atuando como uma fonte de cálcio e fosfato para os dentes afetados em erupção (Lygidakis, 2010).

## **VI. CONCLUSÕES**

A observação da superfície do esmalte em SEM requer a inexistência de resíduos na sua superfície. Assim, torna-se relevante o estabelecimento de um protocolo que os remova e revele a microestrutura do esmalte, sem que ocorra alteração da sua estrutura. O protocolo B, através da utilização de 2mL de hipoclorito de sódio 5,25% durante 60 segundos e de 2mL de ácido fosfórico 10% durante 20 segundos, revelou-se indicado para este fim, permitindo, assim, a análise da morfologia do esmalte com lesões de HIM.

A superfície do esmalte afetado de dentes com HIM caracteriza-se por um maior grau de desorganização e irregularidade e menor quantidade de estrutura mineral, comparativamente ao esmalte de dentes hígidos. Além disso, apresenta uma suscetibilidade superior à ação dos procedimentos de remoção de resíduos e revelação da microestrutura do esmalte.

O estudo do esmalte afetado por HIM pode revelar-se útil para o desenvolvimento de soluções que permitam ultrapassar as dificuldades associadas a esta condição.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allazzam S, Alaki S, Meligy O. Molar Incisor Hypomineralization, Prevalence, and Etiology. *International Journal of Dentistry*. 2014.
- Agarwal RM, Yeluri R, Singh C, Munshi AK. Enamel Deproteinization using Papacarie and 10% Papain Gel on Shear Bond Strength of Orthodontic Brackets Before and After Acid Etching. 2015; 39(4).
- Ansari G, Oloomi K, Eslami B. Microleakage assessment of pit and fissure sealant with and without the use of pumice prophylaxis. *International Journal of Paediatric Dentistry*. 2004; 14: 272–278.
- Barlett J. Dental Enamel Development: Proteinases and Their Enamel Matrix Substrates. *ISRN Dentistry*. 2013.
- Bar-On B, Wagner D. Enamel and dentin as multi-scale bio-composites. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2012; 12:174–183.
- Bogra P, Kaswan S. Etching with EDTA- An in vitro study. *J Indian Soc Pedo Prev Dent*. 2003; 21(2): 79-83.
- Bozal CB, Kaplan A, Ortolani A, Cortese SG, Biondi AM. Ultrastructure of the surface of dental enamel with molar incisor hypomineralization (MIH) with and without acid etching. 2015; 28(2): 192–198.
- Cate RT. *Oral Histology: Development, Structure and Function*. 5<sup>th</sup> ed. St. Louis, Missouri: Mosby-Year Book, 1998.
- Cehreli ZC, Altai N. Effects of a Nonrinse Conditioner and 17% Ethylenediaminetetraacetic Acid on the Etch Pattern of Intact Human Permanent Enamel. *Angle Orthodontist*. 2000; 70(1).
- Condò R, Perugia C, Maturo P, Docimo R. MIH: Epidemiologic Clinic Study In Paediatric Patient. *ORAL & Implantology*. 2012.
- Fragelli C, Souza J, Jeremias F, Cordeiro R, Santos-Pinto L. Molar incisor hypomineralization (MIH): conservative treatment management to restore affected teeth. *Brazilian Oral Research*. 2015; 29(1):1–7.

Garg N, Jain A, Saha S, Singh J. Essentiality of Early Diagnosis of Molar Incisor Hypomineralization in Children and Review of its Clinical Presentation, Etiology and Management. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 2012; 5(3):190-196.

Gowda L, Mohan DU. Effect of Various Concentrations of Sodium Hypochlorite on Primary Dentin: An *in vitro* Scanning Electron Microscopic Study. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 2012; 37(1).

Hassan AM, Goda AA, Baroudi K. The Effect of Different Disinfecting Agents on Bond Strength of Resin Composites. *International Journal of Dentistry*. 2014.

Ivancik J, Arola D. The importance of microstructural variations on the fracture toughness of human dentin. *Biomaterials*. 2013; 34(4): 864–874.

Lygidakis NA, Dimou G, Marinou D. Molar-Incisor-Hypomineralisation (MIH). A retrospective clinical study in Greek children. II. Possible medical aetiological factors. *European Archives of Paediatric Dentistry*. 2008; 9(4).

Lygidakis NA. Treatment modalities in children with teeth affected by molar-incisor enamel hypomineralisation (MIH): A systematic review. *European Archives of Paediatric Dentistry*. 2010; 11(2).

Lygidakis NA, Wong F, Jälevik B, Vierrou A-M, Alaluusua S, Espelid I. Best Clinical Practice Guidance for clinicians dealing with children presenting with Molar-Incisor-Hypomineralisation (MIH). *European Archives of Paediatric Dentistry*. 2010; 1(2).

Mazaheri R, Pishavar L, Shichani AV, Geravandi S. Effect of different cavity conditioners on microleakage of glass ionomer cement with a high viscosity in primary teeth. *Dent Res J*. 2015; 12(4): 337–341.

Nagar P, Tandil YL, Chandru TP, Gupta A, Kalaria D, Kumar P. 24% Indigenously Prepared Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid Compared to Self-Etching Adhesives and their Effect on Shear Bond Strength of Composites in Primary Teeth: An *in vitro* Study. *Journal of International Oral Health*. 2015; 7(8):52-56.

Oyedele TA, Folayan MO, Oziegbe EO. Hypomineralised second primary molars: prevalence, pattern and associated comorbidities in 8- to 10-year-old children in Ile-Ife, Nigeria. *BMC Oral Health*. 2016; 16(65).

Rensburg J. *Oral Biology*. Carol Stream, IL: Quintessence Publishing, 1995. ISBN 0-86715-271-0.

Riviera-Prado, *et al.* EFFICIENCY IN BRACKET BONDING WITH THE USE OF PRETREATMENT METHODS TO TOOTH ENAMEL BEFORE ACID ETCHING: SODIUM HYPOCHLORITE VS. HYDROGEN PEROXIDE TECHNIQUES. *Acta Odontol. Latinoam.* 2015; 28(1): 79-82.

Robinson C, Shore C, Brookes J, Strafford S, Wood SR, Kirkham J. The Chemistry of Enamel Caries. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine.* 2000; 11(4): 481–495.

Schroeder HB. *Oral Structural Biology: Embryology, Structure, and Function of Normal Hard and Soft Tissues of the Oral Cavity and Temporomandibular Joints.* New York: Thieme Medical Publishers, 1991. ISBN 0-86577-381-5.

Trindade A, *et al.* Consequences of Enamel Preparation with Sodium Hypochlorite, Polyacrylic and Phosphoric Acids for the Bonding of Brackets with Resin-modified Glass Ionomer Cements. *Materials Research.* 2013; 16(6): 1423–1427.

Venezie R, Vadiakas G, Christensen J, Wright J. Enamel pretreatment with sodium hypochlorite to enhance bonding in hypocalcified amelogenesis imperfecta: case report and SEM analysis. 1994; 16(6): 433–436.

Vennat E, Wang W, Genthial R, David B, Dursin E, Gourrier A. Mesoscale porosity at the dentin-enamel junction could affect the biomechanical properties of teeth. *Acta Biomaterialia.* 2017.

Weerheijmk KL. Molar Incisor Hypomineralisation (MIH). *European Journal of Paediatric Dentistry.* 2003; 3. (a)

Weerheijmk KL, *et al.* Judgement criteria for Molar Incisor Hypomineralisation (MIH) in epidemiologic studies: a summary of the European meeting on MIH held in Athens, 2003. *European Journal of Paediatric Dentistry.* 2003; 3. (b)

Xie Z, Swain M, Munroe P, Hoffman M. On the critical parameters that regulate the deformation behaviour of tooth enamel. *Biomaterials.* 2008; 29: 2697–2703.

Zhou W, Wang Z. *Scanning Microscopy for Nanotechnology.* 1<sup>st</sup> ed. New York: Springer, 2007.

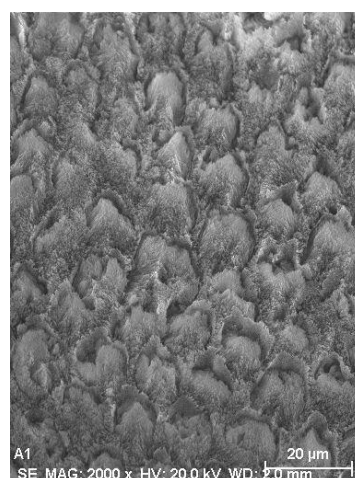


## VIII. ANEXOS

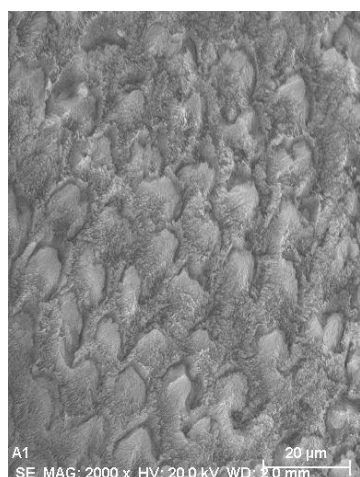
### ANEXO I – FOTOGRAFIAS DE SEM DO ESPÉCIME A1



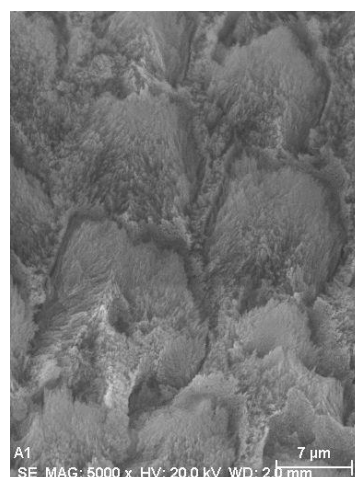
(a)



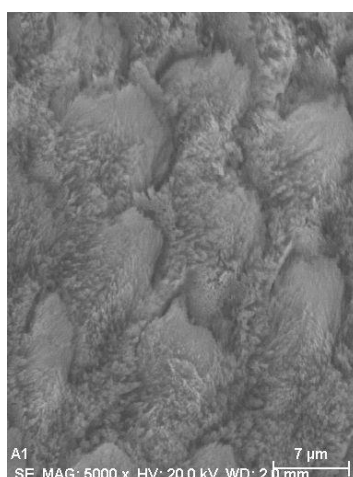
(b)



(c)



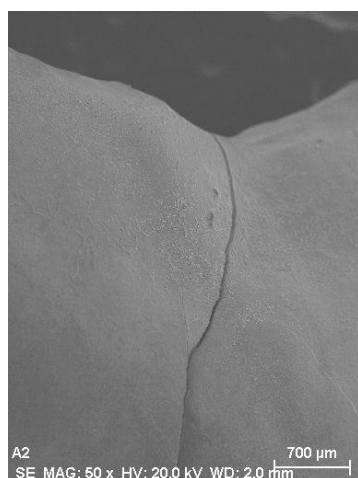
(d)



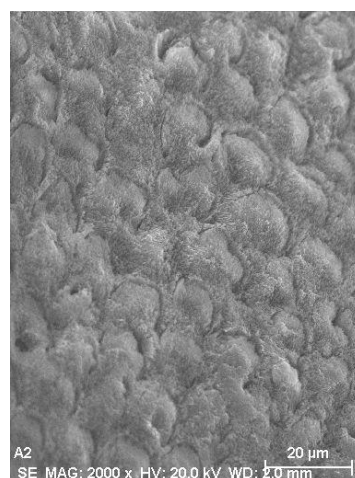
(e)

**Fig. A** – Fotografias de SEM de espécime A1  
(a) 50x; (b) e (c) 2000x; (d) e (e) 5000x

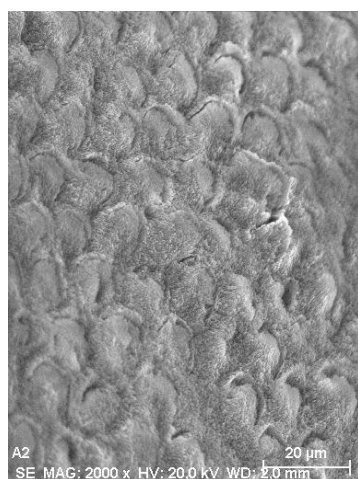
## ANEXO II – FOTOGRAFIAS DE SEM DO ESPÉCIME A2



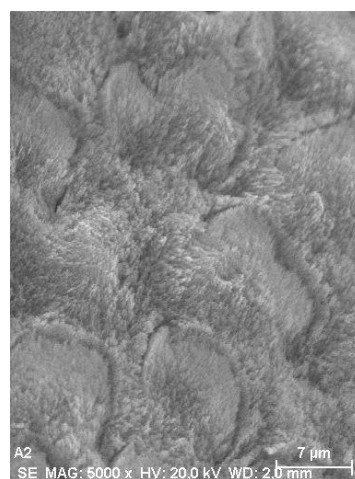
(a)



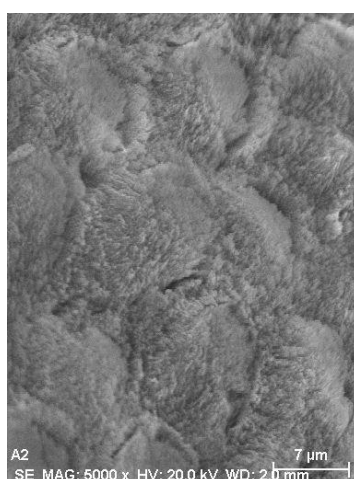
(b)



(c)



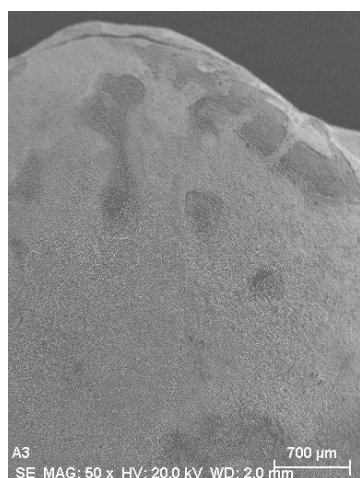
(d)



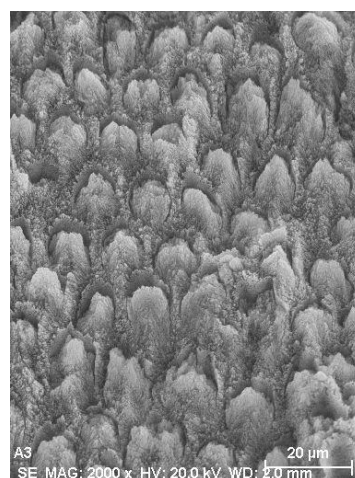
(e)

**Fig. B** – Fotografias de SEM de espécime A2  
(a) 50x; (b) e (c) 2000x; (d) e (e) 5000x

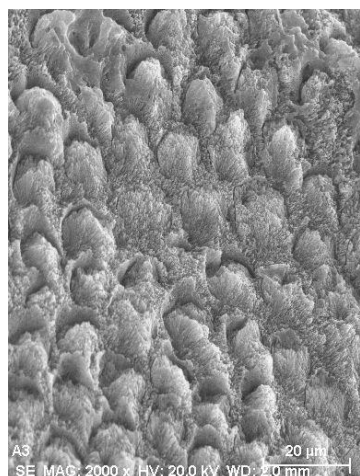
### ANEXO III – FOTOGRAFIAS DE SEM DO ESPÉCIME A3



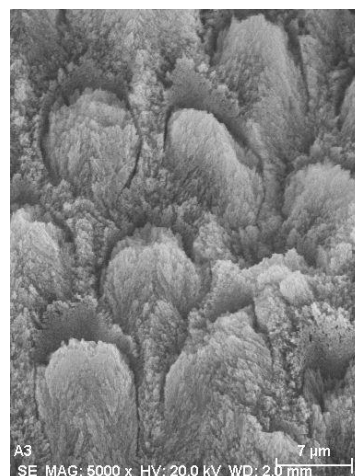
(a)



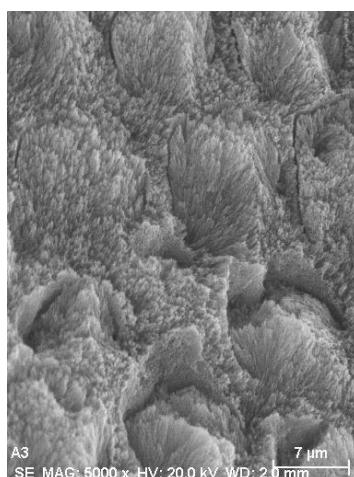
(b)



(c)



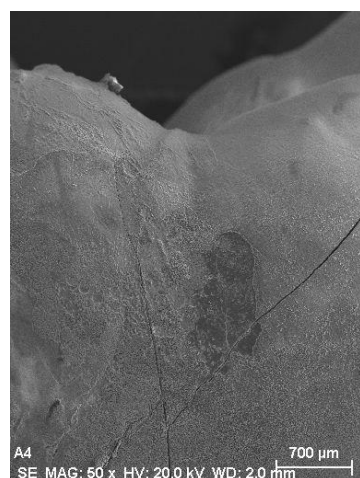
(d)



(e)

**Fig. C** – Fotografias de SEM de espécime A3  
(a) 50x; (b) e (c) 2000x; (d) e (e) 5000x

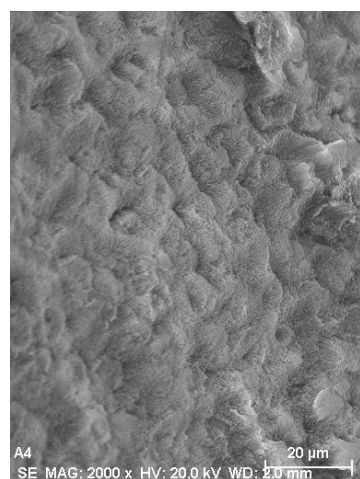
#### ANEXO IV – FOTOGRAFIAS DE SEM DO ESPÉCIME A4



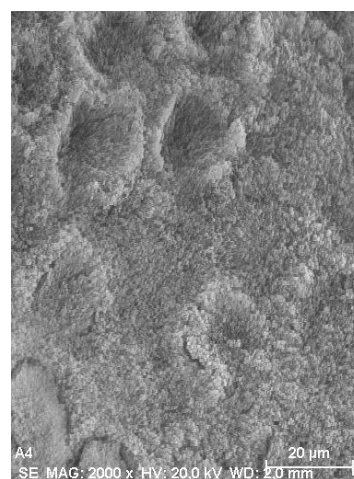
(a)



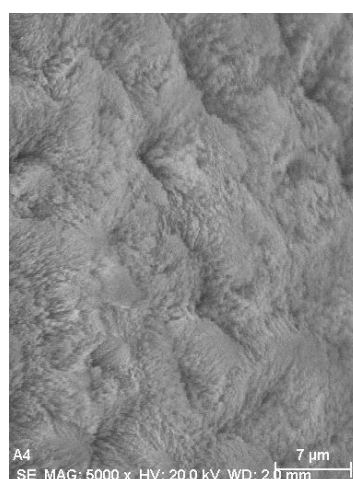
(b)



(c)



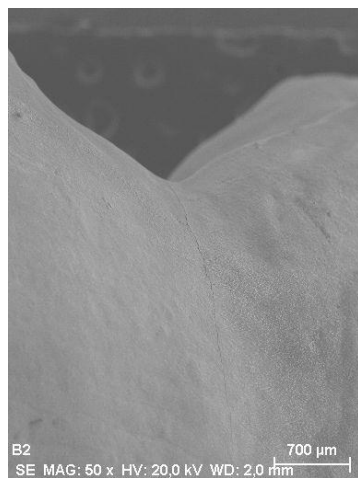
(d)



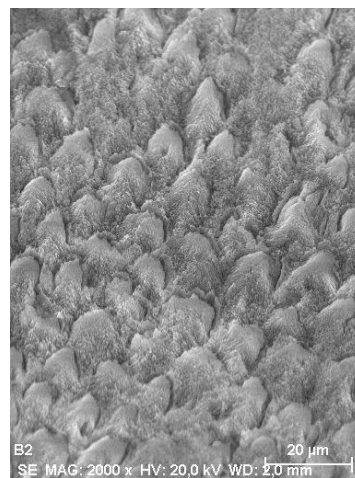
(e)

**Fig. D** – Fotografias de SEM de espécime A4  
(a) 50x; (b) e (c) 2000x; (d) e (e) 5000x

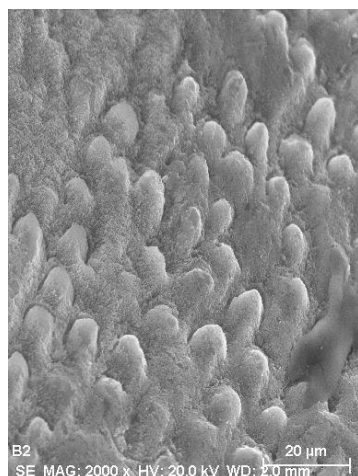
## ANEXO V – FOTOGRAFIAS DE SEM DO ESPÉCIME B2



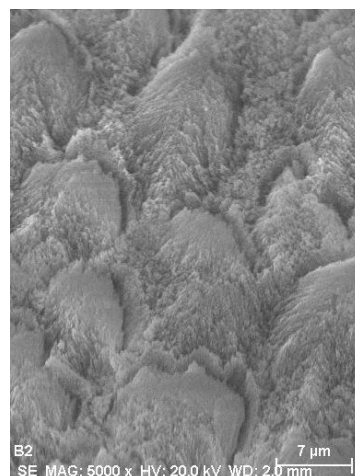
(a)



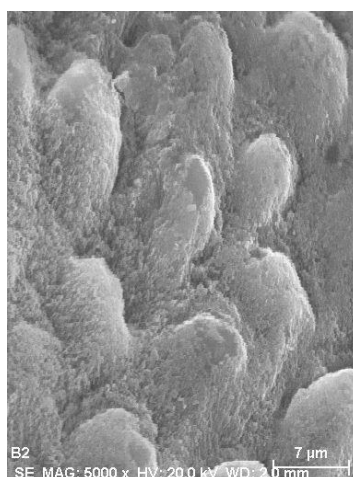
(b)



(c)



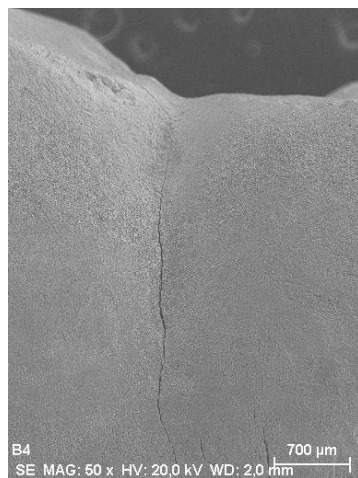
(d)



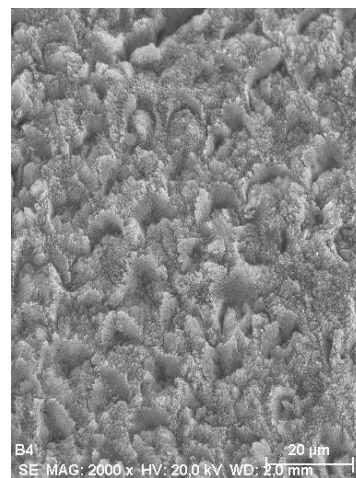
(e)

**Fig. E** – Fotografias de SEM de espécime B2  
(a) 50x; (b) e (c) 2000x; (d) e (e) 5000x

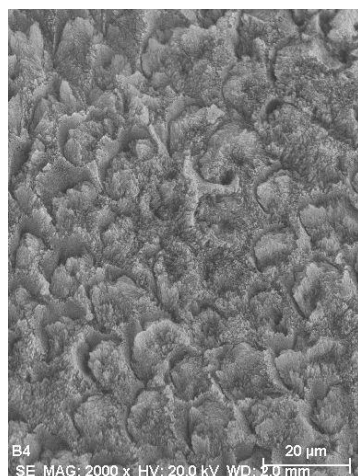
## ANEXO VI – FOTOGRAFIAS DE SEM DO ESPÉCIME B4



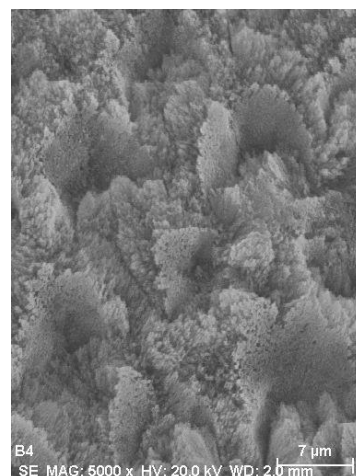
(a)



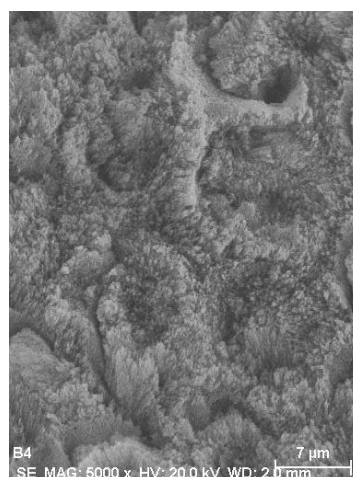
(b)



(c)



(d)



(e)

**Fig. F** – Fotografias de SEM de espécime B4  
(a) 50x; (b) e (c) 2000x; (d) e (e) 5000x

